

BEST AVAILABLE COPY



(19) RU⁽¹¹⁾ 1 347 224⁽¹³⁾ C
(51) МПК⁶ А 61 К 39/40

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4066843/13, 08.05.1986

(46) Дата публикации: 20.11.1995

(56) Ссылки: Гогияшвили Д.А. Антитоксические свойства противосибиреязвенных сieroпрепаратов. Автореферат диссертации. М., 1975. Ветеринарные биопрепараты. /Под ред. Д.Ф.Осидзе, М., 1981, с. 163 - 176. Авторское свидетельство СССР N 731631, кл. А 61К 39/40, 1974.

(71) Заявитель:
Всесоюзный государственный
научно-контрольный институт ветпрепаратов

(72) Изобретатель: Романов Г.И.,
Маничев А.А., Саленко Л.С., Степанова
В.В., Захаров Д.Г., Комелина Л.И., Бондаренко
Н.А., Тимошенко С.М., Поляков В.А., Митин
С.С.

(73) Патентообладатель:
Всесоюзный государственный
научно-контрольный институт ветпрепаратов

(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

(57) Изобретение относится к ветеринарной микробиологии, в частности к производству ветеринарных биологических препаратов. Цель изобретения повышение специфической активности сыворотки, упрощение и ускорение способа ее получения, более эффективное использование продуцентов. В качестве антигена для гипериммунизации лошадей-продуцентов используют вегетативную культуру вакцинного бескапсульного сибиреязвенного штамма СТИ 1. Гипериммунизацию проводят в два этапа: производят 5 инъекций антигена параллельно подкожно в возрастающих дозах от 0,4 - 0,6 до 4,0 6,0 млрд. микробных клеток и внутривенно в постоянных дозах 0,4 0,6 млрд. клеток, на втором этапе производят

8 инъекций антигена подкожно в возрастающих дозах от 8,0 12,0 до 78,0 126,0 млрд. клеток. Интервал между инъекциями 3 4 дня. Через 7 9 дней после окончания гипериммунизации производят крововзятие от каждого продуцента. Отделяют сыворотку общепринятым методом. Сыворотку используют для профилактики и лечения сибирской язвы. Препарат животным вводят подкожно или внутримышечно. Полученная сыворотка обладает высокой протективной и терапевтической активностью, широким спектром защитного действия в отношении разных вирулентных сибиреязвенных штаммов. Специфическая активность препарата сохраняется в течение 3,5 лет после изготовления. 3 табл.

RU 1 347 224 C

RU 1 347 224 C



(19) **RU** (11) **1 347 224** (13) **C**
(51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 39/40**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4066843/13, 08.05.1986

(46) Date of publication: 20.11.1995

(71) Applicant:
Vsesojuznyj gosudarstvennyj
nauchno-kontrol'nyj institut vetpreparatov

(72) Inventor: Romanov G.I.,
Manichev A.A., Salenko L.S., Stepanova
V.V., Zakharov D.G., Komelina L.I., Bondarenko
N.A., Timoshenko S.M., Poljakov V.A., Milin S.S.

(73) Proprietor:
Vsesojuznyj gosudarstvennyj
nauchno-kontrol'nyj institut vetpreparatov

(54) **METHOD FOR PRODUCING SERUM AGAINST ANTHRAX**

(57) **Abstract:**

FIELD: veterinary medicine. SUBSTANCE:
method involves using vegetative culture of
vaccinal capsules anthrax strain STI-1 as
antigen for hyperimmunizing producer horses.
Hyperimmunization is carried out in two
stages. First, five injections of the
antigen are subcutaneously administered
concurrently at increasing doses from
0.4-0.6 to 4.0-6.0 milliards of microbial
cells and intracutaneously administered at
constant doses from 8.0-12.0 to 78.0-126.0
milliards of cells. The second stage

involves subcutaneously administering eight
injections of the antigen at increasing
doses from 8.0-12.0 to 78.0-126.0 milliards
of cells. Pause between the injections is
3-4 days long. Blood is taken from each
serum producer 7-9 days later, after the
hyperimmunization is over. The serum is used
for treating and preventing anthrax. The
preparation is administered subcutaneously
or intra muscularly. EFFECT: high
therapeutic and protective activity; wider
range of applications. 3 tbl

RU 1 347 224 C

RU 1 347 224 C

Изобретение относится к ветеринарной микробиологии, в частности к производству ветеринарных биологических препаратов, и может найти применение в ветеринарной практике для лечения и профилактики сибирской язвы животных.

Целью изобретения является повышение специфической активности сыворотки, упрощение и ускорение способа ее получения, более эффективное использование продуцентов.

Пример 1. Приготовление антигена для гипериммунизации.

Споровую культуру штамма СТИ-1 высевают во флаконы с МПБ (рН 7,0 ± 0,2) в количестве 0,2-0,3 см³ и посевы инкубируют в течение 18-20 ч при 37-38°C. По истечении этого срока полученную бульонную культуру проверяют микроскопически и микроскопически на чистоту и типичность роста.

После проверки матричной культуры проводят посевы ее в количестве 5-10 см³ в стеклянные бутылки-четверти, заполненные на 2/3 объема МПБ. Посевы инкубируют в течение 18-22 ч при 37-38°C. Выраженную микробную культуру по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича доводят до концентрации 500-100 млн. микробных клеток/см³, проверяют микроскопически и микроскопически на бактериальную чистоту, типичность, после чего используют для гипериммунизации продуцентов для первых шести инъекций.

Для последующих инъекций используют концентрированную бактериальную суспензию штамма СТИ-1. С этой целью полученную бактериальную суспензию штамма СТИ-1 с концентрацией клеток 500-100 млн./см³ преципитируют калийными квасцами. Квасцы добавляют в количестве 0,1 мас. в виде 4%-ного раствора. Смесь отстаивают в течение 20-30 мин и при помощи сифона отсасывают часть отстоявшейся жидкости (30-40%). Концентрированный остаток микробных клеток (см³) используют для дальнейшей гипериммунизации продуцентов.

Гипериммунизация лошадей. Лошадей 3-6 лет массой не менее 350 кг гипериммунизируют по схеме, представленной в табл.1. При этом суточную бульонную культуру штамма СТИ-1 продуцентам вводят в объемах 1, 2, 4, 5, 10, 20 см³ подкожно (инъекции N 1-6) и 1 см³ внутривенно (инъекции N 1-5), а концентрированный антиген в объемах 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150 см³ (инъекции N 7-13) подкожно.

В процессе обработки схемы гипериммунизации лошадей установлено, что введение антигена в дозах, превышающих максимальные, вызывает резко выраженную нежелательную ответную реакцию организма продуцентов (сильное угнетение, повышение температуры тела, иногда гибель продуцентов). Введение лошадям антигена в дозах меньших, чем минимальные, приводит к получению противосибирезавенной сыворотки специфической активности, уступающей сыворотке, полученной при использовании вирулентных сибирезавенных штаммов.

Взятие крови. Через 7-9 дней после

окончания гипериммунизации производят первое "рабочее" крововзятие от каждого продуцента. Второе и последующие крововзятия производят через 7-9 дней после введения "рабочей" дозы антигена (41,6-67,2 млрд. микробных клеток), которые вводят через 3-4 дня после очередного крововзятия.

Порядок взятия и обработки крови. Кровь от продуцентов берут в градуированные стерильные бутылки емкостью 15-20 л. Первое крововзятие производят из расчета 8-10 см³, а последующие из расчета 16-20 см³ на 1 кг массы лошади.

Для отделения сыворотки применяют общепринятый метод цитрирования крови с последующим сепарированием и дефибринацией плазмы.

Контроль сыворотки на специфическую активность. Контроль сыворотки на активность проводят на трех кроликах, которых после внутривенного введения сыворотки в дозе 2 см³ на 1 кг живого веса заражают культурой вирулентного сибирезавенного штамма Ч-7 в дозе 10 ЛД₅₀. При выживании минимум двух кроликов из трех привитых сыворотку считают активной.

Сыворотка не теряет своей активности в течение 3,5 лет хранения.

Пример 2. Сыворотку используют для профилактики и лечения сибирской язвы. Препарат животным вводят подкожно или внутримышечно в дозах, указанных в табл.2.

Профилактическую активность сывороток определяют в опытах на кроликах и овцах количественным методом в сравнении с активностью сыворотки, полученной с использованием в качестве антигена культур 12 вирулентных сибирезавенных штаммов, т.е. полученной по используемой в настоящее время технологии. Сыворотки (каждую в отдельности) кроликам вводят внутривенно в неразведенном виде и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8 в дозах из расчета по 2 см³ на 1 кг массы кролика, овцам подкожно в дозах 20, 10, 5 и 2,5 см³ на 1 голову. Одновременно привитых сывороткой и контрольных (непривитых) животных заражают культурой вирулентного сибирезавенного штамма Ч-7 подкожно в дозе 20 ЛД₅₀. На каждую дозу сыворотки и в контроль берут не менее четырех животных. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 10 сут, после чего окончательно учитывают результаты. ЕД₅₀ сывороток рассчитывают по методу Кербера в модификации Ашмарина (Ашмарин И.П. Воробьев А.В. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л. 1962).

В результате испытаний установлено, что в опытах на кроликах сыворотка, изготовленная по предлагаемому способу, активнее сыворотки, полученной с использованием культур вирулентных штаммов (ЕД₅₀ соответственно 1,0 и 1,2 см³), а в опытах на овцах значительно превосходит по активности последнюю (ЕД₅₀ соответственно 2,97 и 7,07 см³).

Терапевтическую активность сывороток определяют количественным методом в опытах на кроликах. С этой целью сыворотки кроликам вводят внутривенно в неразведенном виде и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8. Через 24 ч привитых сыворотками и контрольных (непривитых) животных

заражают культурой штамма Ч-7, как при проверке превентивных свойств. На каждую дозу сыворотки и в контроль берут не менее четырех кроликов. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 10 сут, после чего по методу Кербера в модификации Ашмарина рассчитывают ЕД₅₀ сывороток.

Результаты испытаний показали, что сыворотка, изготовленная по предлагаемому способу, по терапевтической активности превосходит сыворотку, полученную с использованием вирулентных штаммов сибиреязвенных штаммов (ЕД₅₀ соответственно 1,4 и 2,0).

П р и м е р 3. Количественным методом (описание метода дано в примере 2) проверены превентивные свойства сывороток, полученных после двенадцатой инъекции антигена (доза 62,4-100,8 млрд. микробных тел), тринадцатой инъекции антигена (доза 78,0-126,0 млрд. микробных тел) и дополнительной четырнадцатой инъекции антигена (доза 93,6-151,2 млрд. микробных тел). Всего проведено 3 опыта, в которых использовано 216 кроликов. Установлено, что сыворотка, полученная от продуцентов после двенадцатой инъекции антигена, менее активна, чем сыворотка, полученная после тринадцатой инъекции (ЕД₅₀ соответственно 2,0 и 1,0 см³). Последующая инъекция антигена не приводит к повышению активности полученных от продуцентов сывороток (ЕД₅₀ остается на прежнем уровне, 1,0 см³). Следовательно, оптимальная схема гипериммунизации лошадей-продуцентов предусматривает 13 инъекций антигена.

П р и м е р 4. Оценка биологических свойств сыворотки (по определению спектра защитного действия в отношении разных штаммов возбудителя болезни).

Спектр защитного действия сывороток, полученных предлагаемым способом и с использованием вирулентных сибиреязвенных штаммов, против 12 вирулентных штаммов возбудителя антракса изучают в опытах на кроликах. С этой целью кроликам внутривенно вводят испытываемые сыворотки (каждую в отдельности) в дозе 2 см³ на 1 кг массы. Одновременно прививают и контрольных (непривитых) животных

заражают культурами вирулентных сибиреязвенных штаммов подкожно в дозе ЛД₅₀. Наблюдение за зараженными животными ведут в течение 10 сут, после чего учитывают опыт. Результаты опытов представлены в табл.3.

Таким образом, проведенные испытания показали, что предлагаемый способ изготовления сыворотки против сибирской язвы обеспечивает получение более эффективного препарата, чем известные способы, с высокой протективной и терапевтической активностью, широким спектром защитного действия в отношении разных вирулентных сибиреязвенных штаммов, сохраняющего свою специфическую активность в течение 3,5 лет после изготовления.

Применение в качестве антигена культуры одного штамма СТИ-1 по указанной схеме позволяет повысить специфическую активность противосибиреязвенной сыворотки, значительно упростить и удешевить технологию ее производства, исключить возможность заражения сибирской язвой людей и обсеменения окружающей среды спорами вирулентных штаммов антракса, в более короткие сроки (43-57 дней вместо 59-109 дней) получить сыворотку, значительно более эффективно использовать продуценты (очередные крововзятия через 10-12 дней вместо 31-80).

Формула изобретения:

СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ путем гипериммунизации продуцентов антигеном из штамма СТИ-1 с последующим выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения специфической активности сыворотки, ускорения и упрощения способа, гипериммунизацию проводят в два этапа, при этом на первом этапе антиген вводят пятикратно, параллельно подкожно и внутрикочно, а на втором восьмикратно подкожно в возрастающих дозах от 8,0 12,0 до 78,0 126,0 млрд. микробных клеток с общим интервалом между введениями 3 4 дня, причем на первом этапе подкожное введение осуществляют в возрастающих дозах от 0,4 0,6 до 4,0 6,0 млрд. микробных клеток, а внутрикочное в дозе 0,4 0,6 млрд. микробных клеток.

RU 1347224 C

RU 1347224 C

50

55

60

-4-

Таблица 1

Номер инъекции	Антиген для гипериммунизации	Путь введения антигена	Доза антигена, млрд. клеток	
			минимальная	максимальная
1	Суточная бульонная культура штамма СТИ-1	Подкожно	0,4	0,6
2	То же	Внутрикожно	0,4	0,6
		Подкожно	0,8	1,2
3	—"	Внутрикожно	0,4	0,6
		Подкожно	1,6	2,4
4	—"	Внутрикожно	0,4	0,6
		Подкожно	2,0	3,0
5	—"	Внутрикожно	0,4	0,6
		Подкожно	4,0	6,0
6	—"	Внутрикожно	0,4	0,6
		Подкожно	8,0	12,0
7	Концентрированная бульонная культура штамма СТИ-1	То же	20,8	33,6
8	То же	—"	26,0	42,0
9	—"	—"	31,2	50,4
10	—"	—"	41,6	67,2
11	—"	—"	52,0	84,0
12	—"	—"	62,4	100,8
13	—"	—"	78,0	126,0

Примечание. Интервал между инъекциями 3-4 дня;
"рабочая" доза антигена 41,6-67,2.

Таблица 2

Вид животного	Доза сыворотки, см ³	
	предохранительная	лечебная
Лошади и верблюды	15-20	100-200
Взрослый крупный рогатый скот	15-20	100-200
Овцы, козы, свиньи, телята	8-10	50-100

Таблица 3

Вирулентные сибиреязвенные штаммы, используемые для заражения кроликов	Процесс выживших кроликов при использовании сыворотки, изготовленной по способу	
	известному	предлагаемому
Коломна	90	90
231	100	100
1051/35	70	80
2555/18	70	80
47	90	100
228	90	100
17	90	100
37	50	60
992	80	90
35K-2	60	60
362	80	90
230	60	100

Примечание. Сыворотка считается активной, если предохраняет от гибели не менее 60% зараженных животных.

RU 1347224 C

RU 1347224 C

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)